



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR BIOKÉMIAI TANSZÉK

Válasz Prof. Kellermayer Miklós bírálói véleményére

Köszönöm a bírálónak dolgozatom rendkívül gondos és precíz bírálatát. A bírálatban feltett kérdések a dolgozatban tárgyalt problémák további alapos végiggondolására ösztönöztek, és a közeljövőre tervezett munkáinkhoz is hasznos kiindulópontokat adtak. A feltett kérdésekre adott válaszaim a következők:

1. 3.B ábrán a vázlatosan feltüntetett erőkar alakja és szinkódolása sugall-e a papír síkjára merőleges elmozdulást?

Igen. A feltüntetett orientációban, amelyet a szerkezeti elemek lehető legjobb láthatósága érdekében választottunk, az erőkar felhúzott állapotban kissé a papír síkja alá mutat, míg lecsapott állapotban kissé e sík fölé emelkedik. A térben mintegy 70°-os elmozdulásnak a papír síkjára merőleges komponense azonban csekély a papír síkjában történő elmozduláshoz képest.

2. p. 16. A terhelési arány (duty ratio) sokasági analógiájában fontos kiemelni, hogy az random, szinkronizálatlan motorpopulációra vonatkozik. Egy filamentumba szerveződött miozin esetében elképzelhető-e bizonyos fokú mechanikai szinkronizáció, amely megváltoztatja az effektív terhelési arányt?

Izomélettani kísérletekben régóta kihasznált jelenség, hogy az aktivált izolált izomrostok gyors megrántása illetve a feszülő rostok elengedése („L-step” kísérlet) a miozinféjek részleges szinkronizációját okozza. Az ekkor mérhető tranziens mechanikai válasz elemzése az egyik legfontosabb eszköz az izomműködés molekuláris alapjainak kvantitatív vizsgálatában. E vizsgálatok, illetve a biokémiai és egyedimolekula-biofizikai kísérletek eredményei alapján feltételezhető, hogy *in vivo* a miozin-filamentumokra ható külső erők nagyságuk függvényében a fejek bizonyos mértékű szinkronizációját okozzák. A miozin által hajtott elmozdulással megegyező irányú (asszisztáló) erő az aktinról levált állapotok, míg az ellentétes irányú erő az erősen aktinkötött állapotok betöltésének irányában szinkronizálhatja a rendszert.

3. p. 19. Szál invázió: in vivo körülmények között a károsult kromatid egyik szála hogyan találja meg a testvérkromatid megfelelő szakaszát?

A felvetett kérdésre vonatkozóan véleményem szerint azok a vizsgálatok a leginformatívabbak, amelyekben azt határozták meg, hogy a sejtbeli apparátus milyen valószínűséggel választ hibajavítási templátot különböző eredetű, a sérült régióval homológ DNS-szakaszok közül. G2 fázisban lévő diploid sejtekben a homológ szakasz elhelyezkedhet

az ép testvérkromatidon, a homológ kromoszómán, vagy ektopikusan (más lókuszon, esetleg másik, nem-homológ kromoszómán). Szomatikus sejtekben történő hibajavítás esetén az előbb említett szakaszok közül a testvérkromatid a legalkalmasabb templát, mivel ennek információ-tartalma egyezik legnagyobb valószínűséggel a sérült szakaszéval. Ennek megfelelően megfigyelték, hogy a testvérkromatidról hatékonyabban történik hibajavítás, mint a homológ kromoszómáról (Kadyk & Hartwell (1992) *Genetics* 132:387). Ezt tükrözi az az eredmény is, hogy a G2 fázisban lévő sejtek sokkal ellenállóbbak a röntgensugárzással szemben, mint a G1-sejtek, amelyekben a hibajavításhoz nem áll rendelkezésre testvérkromatid. Ezen és más kísérletekben arra a következtetésre jutottak, hogy a testvérkromatidok fizikai közelsége, illeszkedése és topológiai összekapcsoltsága a rekombináció-alapú hibajavítás sikerének döntő tényezője (Lichten & Haber (1989) *Genetics* 123:261). Nem-meiotikus sejtek nem mutatnak templát-preferenciát a homológ kromoszóma iránt az ektopikus homológ szakaszokkal szemben. Meiotikus sejtekben speciális mechanizmusok működnek annak érdekében, hogy a homológ rekombináció a testvérkromatidok helyett a homológ kromoszómák között történjék. Ezt meiózis-specifikus rekombinációs fehérjék indukciója, illetve a homológ kromoszómák közötti fehérjehidak létrejötte szolgálja (Haber (2000) *Trends Genet.* 16:259, Thompson & Stahl (1999) *Genetics* 153:621, Grushcow *et al.* (1999) *Genetics* 153:607).

A templát-preferenciával kapcsolatos fenti következtetésekkel összhangban lévő érdekes megfigyelés, hogy endogén nukleázok által indukált kromoszóma-töréssel szabaddá vált szakaszok hibajavításához a sejt a teljes genomból preferencia nélkül választ rekombinációs partnert (Haber & Leung (1996) *PNAS* 93:13949, Richardson *et al.* (1998) *Genes Dev.* 12:3831).

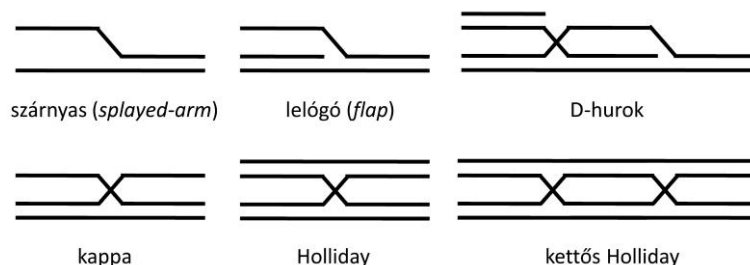
4. p. 20. Mi határozza meg, hogy a BLM számos aktivitása közül melyik manifesztálódik?

Jelen ismereteink szerint az enzim által kötött DNS-szubsztrát szerkezete a döntő tényező az aktivitások kifejeződésében. Egyszálú DNS-szakaszon a BLM 3'-5' irányú transzlokációt végez. Ha a transzlokáció a DNS-hez kötött másik fehérje (pl. Rad51 rekombináza) illetve a sínszálhoz kapcsolódó komplementer DNS-szál formájában akadályba ütközik, akkor az enzim fehérje-eltávolító illetve DNS-szálszétválasztó aktivitása manifesztálódik. Mozgatható elágazást („hidat”) tartalmazó háromszálú „kappa”, illetve négyszálú Holliday-szerkezetű DNS-szubsztrátokon (alábbi 1. ábra) szálvándorlást (*branch migration*) katalizáló aktivitás indul el. Az adatok arra utalnak, hogy az enzim nagy affinitással kötődik az elágazáshoz, ami „lelógó” (*flap*) szálat tartalmazó háromszálú szubsztrátok, illetve az elágazáshoz hasonló elemet tartalmazó kétszálú, részben komplementer „szárnyas” (*splayed-arm*)-szubsztrátok esetében (1. ábra) is megfigyelhető. A szálvándorlás-katalizáló aktivitás elvben szétválasztható egy (illetve négyszálú szubsztrát esetében két) szálszétválasztó, és a szétválasztás nyomán az új szálakat illesztő (anelláló) aktivitásra. Fontos felderítetlen probléma, hogy ezek az aktivitások ténylegesen és elkülönülten megvalósulnak-e a szálvándorlás során, illetve hogy ekkor történik-e katalitikus szálllesztés, aminek a szintézisfüggő szálllesztésnek (*synthesis-dependent strand annealing*, SDSA) nevezett rekombinációs útvonalon is kiemelkedő szerepe lehet. Kérdéses továbbá, hogy az ilyen illesztő aktivitás hogyan függ össze a BLM és más helikázok ATP távollétében, magas enzim:DNS molaránynál megfigyelhető DNS-szálpárosodás-gyorsító sajátosságával.

A BLM helikáz legfontosabb összetett DNS-szerkezeteket átalakító aktivitásai közé tartozik a D-hurok szerkezetek (1. ábra) felbontása, illetve a kettős Holliday szerkezetek konvergens szálvándorlással történő megoldása is (utóbbihoz topoizomeráz IIIa és más

partnerfehérjék közreműködése is szükséges), amely működéseket szintén a DNS-szubsztrát szerkezete indukálja.

A BLM helikáz aktivitásait minden bizonnyal szabályozza az enzim foszforilációja, illetve partnerfehérjék kötődése is. Ezekről a mechanizmusokról átfogó ismeretekkel még nem rendelkezünk; jelenleg vizsgáljuk a Rad51 fehérjével történő együttműködés sajátosságait.



1. ábra: A BLM helikáz néhány különböző szerkezetű DNS-szubsztrátja

5. p. 21. Az erőkar hogyan értelmezendő a helikázokban?

A DNS mentén araszoló mozgást végző SF1 és SF2 szupercsaládbeli helikázok motoregységéből nem indul ki jelentős elfordulást végző erőkar. Az elmozdulás elemi lépése, a munkaütem (*powerstroke*) a motoregységen belül zajlik le úgy, hogy a haladási irány szerinti elülső RecA-domén először eltávolodik a hátsó RecA-doméntól, majd a hátsó domén visszazárásával fejeződik be a lépés. Ezeket a mozgásokat az ATPáz ciklus lépéseire kapcsolt konformáció- és DNS-affinitás-változások koordinálják (Velankar *et al.* (1999) *Cell* 97:75, Lee & Yang (2006) *Cell* 127:1349). Az ATPáz ciklus és az elemi elmozdulás koordinációja így termodinamikai értelemben analóg az erőkart használó miozin-mechanizmusokkal.

6. A single-turnover stopped-flow kísérletek mennyiben vehetők analógnak az egyedi molekula kísérletekkel?

A molekula-populációkkal végzett *single-turnover* kinetikai kísérletek nem mutatnak nagyobb elvi hasonlóságot az egyedi molekula kísérletekhez, mint más elrendezésekben végzett oldat- („*bulk*”) kísérletek. *Single-turnover* esetben is fennáll, hogy térben és időben a molekulapopuláció összességének viselkedését detektáljuk, és az egyedeknek a sokaság viselkedéséhez való hozzájárulása nem követhető, így azt statisztikusan kezeljük az eredmények értékelésekor.

7. A stopped-flow kísérletekben injektált aktin vélhetően F-aktin volt. Mekkora volt az átlagos aktin filamentum hossz? Az injektáláskor fellépő nyíróerő milyen hatással van az aktin filamentumokra és az aktomiozin komplexre? Előfordulhat-e aktin filamentum töredezés? Ha igen, akkor ez milyen hatással lehet az enzimreakcióra, és különösen processzív motorok esetén a detektálható processzív futási hosszra?

Az általunk preparált aktinfilamentumok elektronmikroszkópos, illetve a fluoreszcensen jelölt aktinból felépült filamentumok fénymikroszkópos vizsgálatából tudjuk, hogy az alkalmazott körülmények között a filamentumok nagy többségének hossza legalább egy nagyságrenddel

meghaladta a vizsgált miozinok várható futási hosszát (utóbbi maximuma a vizsgált esetek közül 1,3 μm -nek adódott vad típusú miozin 5a esetén; 25. cikk a dolgozatban).

Az aktinfilamentumok töredezése ultrahanggal, illetve erőteljes pipettázással előidézhető, és így (mikroszkópos vizsgálatok alapján) az átlagos filamentumhossz 1 μm alá eshet. Az ilyen szándékosan „aprított” filamentumokkal végzett kísérletekben a vizsgált miozinok oldatkinetikai sajátosságai megegyeztek a normál hosszeloszlású aktinfilamentumok jelenlétében tapasztaltakkal. A gyorskeveréses kísérletekben fellépő nyíróerő valószínűleg kiváltja az aktin filamentumok egy részének töredezését, ami egyes kísérletekben fényszórás- illetve fluoreszcencia-tranzienseket eredményez. E műtermékek jellemzően az 1-5 ms közötti, illetve 1 percnél hosszabb időskálákon jelentkeztek, amelyek közül a gyors jelenséget a törésnek, míg a lassabbat a törés által kiváltott átrendeződéseknek tulajdonítjuk. Minden esetben miozinmentes kontrollokkal ellenőriztük, hogy az általunk miozin által kiváltotként értelmezett változások nem az aktinfilamentumok töredezéséből adódtak.

A processzív futáshosszot vizsgáló egyedimolekula-kísérleteinkben az olyan, hosszú aktinfilamentumokon zajló eseményekre fókuszáltunk, amely filamentumok esetében a futás-terminációk túlnyomó többsége a miozin az aktinvég elérése előtt bekövetkező disszociációjából adódott.

8. A NM2 minifilamentumok (14. ábra) hosszát mi szabályozza in vivo? Lehetséges előállítani NM2 szintetikus filamentumokat in vitro? Ezeknek milyen a hosszeloszlása?

Niederman és Pollard (133. hivatkozás a dolgozatban) elektronmikroszkópos vizsgálataiból tudjuk, hogy az izolált NM2A *in vitro* szabályos méreteloszlású, 340 nm körüli hosszúságú (jellemzően 25 nm körüli S.D. értékkel) és 10-11 nm vastagságú bipoláris minifilamentumokat képez. Modellezés alapján a szerzők azt javasolták, hogy a minifilamentumok pólusonként 14 miozinmolekulát tartalmaznak. Érdekes módon az izolált farokrész által létrehozott filamentumok méreteloszlása kevésbé volt szabályos, ami arra utal, hogy a fejek és a farokrész közötti kölcsönhatások hozzájárulnak a szabályos minifilamentumok képződéséhez. Egy későbbi munkában fibroblasztok citoplazmájában a Niederman és Pollard által *in vitro* megfigyelttel megegyező méretű NM2 minifilamentumok jelenlétét mutatták ki (Verkhovsky *et al.* (1995) *J. Cell Biol.* 131:989). Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a szabályos minifilamentumok *in vivo* segédfehérjék nélkül is képesek kialakulni.

9. p. 37-38. Az ADP koncentráció emelésével az NM2 motor járó lelassulás jár-e a processzivitás növekedésével?

Igen, a modell szerint az ADP által okozott termékgátlás az erősen aktinkötött aktomiozin-ADP állapotnak mind az életidejét, mind pedig *steady-state* részarányát megnöveli, ami elvben a processzivitás növekedését okozza. Ennek mérése technikailag nehezen kivitelezhető, de Ronald Rock munkacsoportjának egyedimolekula-eredményei (197. hiv.) is alátámasztják ezt a feltételezést.

10. A processzivitást valójában mi határozza meg? Bár régóta ismert, hogy a magas terhelési arányú motorok processzívek és megfordítva, azonban ez a tapasztalat nem teljesen fedi fel a molekuláris mechanizmusokat. A processzivitás sínen megtett távolság ("processzív futási távolság") szerinti definíciója egy élettartam típusú változóra emlékeztet. Azonban egy futás során számos, egymást követő, első megközelítésben biokémiailag teljesen azonos egyedi

mechanokémiai ciklus valósul meg. Mitől és hogyan lép fel a futási távolság utáni sínről való leválás? Lehetséges, hogy egy adott motormolekulára nézve az egymást követő ciklusok nem teljesen azonosak? Emlékezhets-e a motorfehérje a megtett mechanokémiai ciklusok számára, és ilyen értelemben rendelkezik-e memóriával? Ide tartozik, hogy a miozin 5 esetére, amelyekben az egyedi fejek terhelési aránya 70% (p. 57), hogyan történt az átlagos 10 lépésnyi futási ciklus kiszámítása?

A processzív futáshossz kísérletesen meghatározott exponenciális gyakoriság-eloszlásának magyarázatához elégséges egy egyszerű, biokémiailag azonos ciklusok sorozatából álló modell, amely a 22. cikkben részletezett számításaink alapjául is szolgált. E modellben egy adott mechanokémiai ciklusban a transzlokáció k_t sebességi állandóval, a sínről történő disszociáció pedig k_d sebességi állandóval történik. E két állandó meghatározza a továbblépés valószínűségét ($P = k_t/(k_t+k_d)$), amely processzivitásként definiálható, és a kísérletekben tapasztalt exponenciális, $\langle n \rangle = P/(1-P)$ várható lépésszámmal jellemezhető futáshossz-eloszlást eredményezi. A jelenleg ismert adatok magyarázatához nem szükséges az egyes ciklusok inherens különbözőségének illetve az enzim memóriájának feltételezése.

Az *E. coli* UvrD enzim egyszálú DNS-en történő transzlokációját ún. „nem-uniform” lépési mechanizmussal írták le, amelyben egy sebesség-meghatározó mechanokémiai ciklust 4-5 (kísérletesen ennél pontosabban nem meghatározható számú) gyorsabb ciklus követ (205. hiv.). Fontos megjegyezni, hogy ez a modell is beilleszthető a fenti elvi keretbe úgy, hogy két egymást követő sebesség-meghatározó lépés közötti eseménysorozatot tekintünk egy ún. „kinetikai” ciklusnak.

Az 57. oldalon található elméleti megfontolással azt kívántam illusztrálni, hogy a miozin 5a kísérletesen mért, 60 lépésnyi várható futáshossza jóval meghaladja a legegyszerűbb lépési modell alapján, koordináció hiányában várható értéket. Egy szélsőségesen leegyszerűsített modellben az egyedi fejek mechanokémiai ciklusa mindössze egy sínkötött és egy sínről levált állapotból áll, amelyek között az átmenetek k_{att} illetve k_{det} sebességi állandóval történnek a kötés illetve a leválás irányába. Ekkor egy adott mechanokémiai lépés valószínűségét közelítőleg az fogja meghatározni, hogy az egyik fejjel sínkötött molekula mekkora valószínűséggel kerül két fejjel kötött állapotba ahelyett, hogy mindkét feje disszociálna a sínről. Ennek valószínűsége $P = k_{att}/(k_{att}+k_{det})$, ami megegyezik a terhelési arány (*duty ratio*) definíciójával. A várható lépésszám így a fentiek alapján $\langle n \rangle = P/(1-P)$ lesz, ami a mások által korábban a csirke miozin 5a-ra becsült $P = 0,7$ esetén 2,3 lépésnek, a 25. cikkünkben egér miozin 5a-ra becsült $P = 0,94$ alapján 16 lépésnek adódik. Az 57. oldalon megadott terhelési arány- és lépésszám-értékek ezek alapján nem konzisztensek. Köszönöm a bírálónak, hogy kérdésével segítette ennek tisztázását.

11. p. 37, 24. ábra. Az ábra alapján nagy a kísértés, hogy függvénykapcsolatot állítsunk fel a terhelési arány és a ciklusidő között. Lehetséges ez? Ha igen, mi az alapja és mi lehet az értelme?

A miozin 2 osztálybeli izoformák 24. ábrán bemutatott adatai valóban azt sugallják, hogy a terhelési arány pozitívan korrelálhat a ciklusidővel. A számos miozin osztály adatait bemutató 28. ábrán azonban az látszik, hogy – biológiai funkciótól függően – egy adott terhelési arányhoz jelentősen eltérő aktinkötési élettartam (és ezek által meghatározott eltérő ciklusidő) tartozhat a különböző miozinokban. Ugyanezen az ábrán látszik az is, hogy inkább az aktin- és ADP-kötés közötti termodinamikai kapcsoltság mutat negatív korrelációt a terhelési aránnyal. Ebből az a fontos következtetés vonható le, hogy a terhelési arány növelését a

miozinok leggyakrabban – a ciklusidő hosszától függetlenül – az ADP-felszabadulás aktin-aktivációjának mérséklésén keresztül érik el.

12. Az akto-NM2B-HMM komplex ADP chase kísérletében (38. ábra, p. 55) hogyan történt a két fázis miozin fejek szerinti azonosítása? Más szóval, honnan lehet tudni, hogy a gyors illetve lassú átmenetek az elülső vagy hátsó fejre vonatkoznak-e?

Az említett munka (17. cikk) kísérlet-sorozatában azt tudtuk megállapítani, hogy a két ADP-felszabadulási kinetikai fázis a miozin két különböző pozíciójú fejéhez rendelhető. Az eredményekből nem volt lehetséges annak azonosítása, hogy melyik fázis tartozik az elülső illetve hátsó fejekhez. A hozzárendeléshez azt – a korábbi lézercsapda-kísérletekből származó – információt használtuk fel, hogy mind az NM2-höz legnagyobb hasonlóságot mutató simaizom miozin 2, mind pedig a miozin 5a ADP-felszabadulását a munkaütem (*powerstroke*) irányába ható erő gyorsítja, az ellentétes irányú erő pedig lassítja (Veigel *et al.* (2003) *Nat. Cell Biol.* 5:980 illetve 198. hiv.). Ezt a sajátságot későbbi lézercsapda-kísérletekben NM2B esetében is igazolták (197. hiv.).

13. Ugyancsak az akto-NM2-HMM kísérletekre vonatkozóan, meg lehet-e becsülni a fejekre ható torziós erőt a nyaki domén polimermechanikai tulajdonságai alapján?

Az NM2 fejeknek a kinetikai kísérleteinkben meghatározott, különböző irányú erőhatások által előidézett ADP-affinitás-változása érdekes következtetésekre ad alapot a fej mechanikáját, illetve a fellépő torziós erőket illetően. Ha feltesszük, hogy (a) az ADP-kötés szabadentalpiájában tapasztalt erőfüggő változások teljes egészében a torziós hatásból erednek, (b) az elülső és hátsó fejek torziós elmozdulásának összege 9 nm (Chakrabarty *et al.* (2002, *PNAS* 99:6011) vázizom miozin 2-n végzett FRET mérései alapján), illetve (c) az elülső és hátsó fejek rugóállandója azonos, akkor NM2A esetében 0,59 pN/nm-nek, NM2B esetén pedig 0,77 pN/nm-nek adódik a fejek rugóállandója. Ez alapján az egyes NM2 fejekre ható torziós erők értéke 2,5 és 3,9 pN közé becsülhető. Ezek az értékek jól egyeznek más miozinokon kapott lézercsapda-eredményekkel, amelyek alapján a vázizom miozin 2 fej rugóállandója 0,69 pN/nm (Veigel *et al.* (1998) *Biophys J.* 75:1424), a simaizom miozin 2-é pedig 0,45 pN/nm (Veigel *et al.* (2003) *Nat. Cell Biol.* 5:980). Érdekes módon, a hosszabb és flexibilisebb nyakkal rendelkező, 0,20 pN/nm rugóállandójú miozin 5a esetében is hasonlóan adódott a mindkét fejjel aktinhoz kötött molekula fejeire ható torziós erő (3,6 pN; 198. hiv.).

Egy, a fésűskagyló záróizom miozin nyaki régióját vizsgáló, közelmúltban publikált krisztallográfiai tanulmány szerint a miozinfej flexibilitásának fő forrása lehet a nyaki nehézlánc-szegmens C-terminális részén található „kampót” és a regulációs könnyűlánc egy α -hélixét tartalmazó régió, amely két különböző konformációt vehet fel, és így akár 1 nm-rel modulálhatja a nyak hosszúságát (Brown *et al.* (2011) *PNAS* 108:114).

14. p. 47. A miozin mechanokémiai kinetikai útvonalainak kellő megválasztásával elvben lehetségessé válhat, hogy a nem-processzív izom-miozin 2 egyedi molekula mechanikai kísérletekben vizsgálhatóvá váljék? Bármennyire hihetetlen ugyanis, az izom-miozin 2 által kifejtett maximális, egy molekulára eső izometriás erőt mind a mai napig nem ismerjük.

Mind az egyedi miozinfejek által kifejtett „egységnyi” izometriás erőre, mind pedig az izometriás terhelési arányra nézve vannak – ahogyan a bíráló is megjegyzi, vitatott – adatok az irodalomban. Linari *et al.* (2007, *Biophys. J.* 92:2476) szerint a nyúl *m. psoas* rostjaiban

izometrikus kontrakció során a miozinefejek mintegy 33 %-a kötődik egyidejűleg erősen az aktinhoz. Az egységnyi erő nagyságát permeabilizált rostokon végzett vizsgálatok alapján 20°C körüli hőmérsékleten 5-7 pN-ra becsülik különböző izomtípusokban (Decostre *et al.* (2005) *PNAS* 102:13927, Linari *et al.* (2007) *Biophys. J.* 92:2476), míg egyedi aktomiozin kölcsönhatások lézercsipeszes vizsgálataiban 1,7 pN-tól (Molloy *et al.* (1995) *Nature* 378:209) a 10 pN-nál nagyobb értékekig (Takagi *et al.* (2006) *Biophys. J.* 90:1295) közöltek eredményeket.

15. p. 53. Ha a mechanikailag terhelt NM2 molekulában nincs elmozdulás, és ráadásul gyakorlatilag teljesen leáll az enzimatis ciklus, akkor értelmezhetetlenné válik a munkavégzés (amely ekkor 0) és így a fizikai értelemben vett hatásfok is. Nemde egyszerűen arról van szó, hogy ilyenkor a molekula egyfajta "lakatként" viselkedik?

Az elmozdulást nem produkáló, „erőtartó” vagy „lakat” üzemmódban lévő NM2 motor munkavégzése valóban 0. Az ilyenkor fellépő alacsony ATP-fogyasztást mint „árat” a sejt azért fizeti, hogy a passzív erőtartó elemek helyett – illetve mellett – a változó, fluktuáló sejtbeli környezetben autonóm mechanikai válaszra és irányfüggő erőtartásra képes, verzátilis, adott esetben kontraktilis funkcióra kapcsolható motorral rendelkezessen.

16. p. 55-56. A NM2 molekulára ható visszahúzó erő hatására az erősen aktin-kötött állapot stabilizálódik, és aktomiozin disszociáció nagymértékben lelassul. Külső mechanikai erő hatására a kémiai kötések élettartama rövidül, a kötési reakció lassul, és a disszociáció gyorsul. A predikcióval ellentétes megfigyelésről van szó tehát. Mivel az aktomiozin állapotokban számos kötés vesz részt, jogosan merül fel a kérdés, hogy a mechanikailag torzított (és stabilizált) akto-NM2 állapotban kialakulnak-e újabb kötések az aktin filamentum és a miozinmolekula között?

A miozin erővezérelt szabályozásának kulcskérdése, hogy a gyenge és erős aktinkötő állapotok közötti átmenet hogyan függ az erőkarra kifejtett külső erőhatástól. Pontos mérési adatok erre vonatkozólag nem állnak rendelkezésre, de fontos megjegyezni, hogy ez a hatás döntően befolyásolhatja a 26. cikkünkben (és a dolgozat 29. ábráján) vázolt modellben kék és piros színnel jelölt alternatív erőgenerálási útvonalak fluxusait is. E két útvonalon az erős aktomiozin kölcsönhatás létrejötte illetve az erőkarlecsapás különböző sorrendben történik. A jelenlegi adatok alapján valószínűsíthető, hogy mindkét útvonal megvalósul, és valószínűségüket a külső erőhatás befolyásolja.

17. A mechanikai erő hatására fellépő ADP-disszociáció gátlásnak mi lehet a molekuláris mechanizmusa? Elképzelhető, hogy az ATP-kötő zseb geometriája torzul, és mintegy mechanikai akadály lép fel a disszociációval szemben?

Mások kísérleteiből és saját munkánkból is világosan látszik, hogy az erőtartó illetve processzív miozinok legalább két különböző stabil ADP-kötött szerkezetet képesek felvenni (Rosenfeld *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280:6072, Hannemann *et al.* (2005) *Biochemistry* 44:8826, illetve 178. és 179. hiv.; valamint 7., 12. és 17. saját cikkek). Az adatokat magyarázó legegyszerűbb modell szerint az ADP-felszabadulást meg kell előznie egy ún. „zárt” szerkezetből egy „nyitott”-ba történő átmenetnek, amely átmenet erőfüggő egyensúlyi állandója nagyban meghatározza az ADP-felszabadulás észlelt sebességi állandóját. A két állapot közötti erőkar-elmozdulás nagysága korrelál az átmenet erőfüggésének mértékével. A

„zárt” állapotban minden bizonnyal „torzul” a nukleotidkötő zseb szerkezete az ADP-disszociáció-kompetens „nyitott” állapotához képest.

18. A miozin motorok szerkezetéből és működéséből adódóan az erőhatás nem csak a csuklópontra, hanem a nyak és a rúd csatlakozási pontján is kell, hogy jelentkezzen. Van-e, vagy várható-e bármilyen speciális szerkezeti feltétel vagy tulajdonság a miozin molekulának ezen a pontján?

A nyak-rúd csatlakozás mechanikai sajátosságait valószínűleg jelentősen befolyásoló szerkezeti sajátosságot írtak le a 13. kérdésre adott válaszban már említett tanulmányban (Brown *et al.* (2011) *PNAS* 108:114). Eszerint a nyaki nehézlánc-szegmens C-terminális részén található „kampót” és a regulációs könnyűlánc egy α -hélixét tartalmazó régió lehet a nyak-rúd csatlakozás flexibilis eleme.

A nyak-rúd csatlakozás flexibilitását a rúd proximális részét alkotó S2 szegmens *coiled-coil* szerkezetének felolvadása is döntően befolyásolhatja. Lee Sweeney csoportja (Chakrabarty *et al.* (2003) *Biochemistry* 42:12886) kimutatta, hogy a mindkét fejjel erősen aktinkötött miozinszerkezet kialakulásához nem szükséges az S2 olvadása. Carolyn Cohen és Nyitrai László csoportjainak adatai viszont azt jelzik, hogy az egyes miozin 2 formák szabályozásában kulcsjelentőségű aszimmetrikus kikapcsolt állapot létrejöttét segíti az S2 proximális részének felolvadása (Li *et al.* (2003) *Nature* 424:341, Brown *et al.* (2007) *J. Mol. Biol.* 375:14349).

19. A hét béta-láncból felépülő transzducer domén érdekes lehetőségeket vet fel. Van-e szerkezeti hasonlóság ezen domén és a hasonlóan hét béta-láncból felépülő Ig vagy FN domének között? Lehet-e következtetni a transzducer domén mechanikai tulajdonságaira az Ig és FN domének mára már aránylag jól jellemzett mechanikai tulajdonságaiból (lásd pl. titint felépítő domének).

A miozin motordoménjében elhelyezkedő hétszálú β -lemez több szubdomén magját alkotó, komplex topológiájú szerkezeti elem. A lemezben paralel és antiparalel szákapcsolatok egyaránt előfordulnak, és az egyes szálakat szekvenciálisan a rövid hajtűkanyartól a szubdomén-méretű inszerciókig terjedő szakaszok választják el. A β -lemez és a környező másodlagos szerkezeti elemek topológiájának módszeres összehasonlítása alkalmat adott a miozinok, kinezinok, G-fehérjék, valamint a RecA-domént tartalmazó DNS-módosító enzimek törzsfa-kutatására is (55. hiv.). Az említett fehérjék központi β -lemezének sokrétű kölcsönhatásai és topológiai viszonyai alapvetően befolyásolhatják annak mechanikai tulajdonságait, ezért kérdéses, hogy párhuzam vonható-e a szerkezetileg egyszerűbb, közvetlenül összekötött β -szálakból felépülő Ig és FN β -szendvics domének jól jellemzett mechanikai sajátosságaival.

Megjegyzendő, hogy a miozin központi β -lemezének az aktinkötéskor bekövetkező torzulása érdekes párhuzamot mutat az F1 ATPáz β -alegység nukleotidkötő doménje központi β -lemezének a nukleotid kötéséhez illetve a termékfelszabaduláshoz kapcsolódó jelentős konformáció-változásaival (Menz *et al.* (2001) *Cell* 106:331; 195. hiv.; illetve lásd alább a 22. válaszban is).

20. A BLM mint helikáz ugyancsak mechanoenzim. Van-e a jelöltnek elképzelése arról, hogy mechanikai erő ellenében hogyan dolgozik ez a molekula, és hogy mekkora lehet a stall force

(megálláshoz szükséges erő)? Egy ilyen molekulakomplex esetében egyáltalán milyen kísérletekben lehetne ezt megmérni?

A mágnescsapda-kísérletekben általánosan alkalmazott DNS-hajtú szubsztrátoknak – az elrendezésből adódóan – csak a szálszétválasztást segítő megnyújtása lehetséges, a szétválasztás ellen ható erők alkalmazása nem megoldott. Ismeretes viszont, hogy a helikázaktivitás zárt kettősszálú DNS-szubsztrát esetén a haladó enzim előtt pozitív (mögötte pedig negatív) szuperhelicitást és topológiai stresszt eredményez, ami topoizomeráz partnerenzim hiányában a szálszétválasztás korai megállását eredményezi. A megálláshoz szükséges erőre lehetne következtetni a megállás előtt szétválasztott szakasz hosszának meghatározásával, amely szakaszt egyszálú DNS-kötő fehérjével lehetne stabilizálni. E mérés azonban valószínűleg technikai nehézségekbe ütközne, mivel a szétválasztott szakasz vélhetőleg túl rövid lenne ahhoz, hogy stabil komplexet alkosson az egyszálú DNS-kötő fehérjével. A megálláshoz szükséges erőt topológiailag korlátozott kettősszálú DNS-molekulák szétválasztásának mágnescsapdás mérésével is lehetne vizsgálni. Itt is valószínű technikai nehézséget jelentene a szétválasztás korlátozott kiterjedése és tranziens mivolta.

21. A BLM egy mechanikai ciklusra eső lépéshossza valójában mekkora? A disszertációban ennek a definíciója az egy ATP-re eső elmozdulás. Azonban nincs itt cirkuláris logika? Nemde arról a mára a molekuláris biofizikában dogmatikus álláspontra vezethető vissza ez a definíció, hogy a mechanoenzimekben szoros csatolás (1 mechanika/1 enzimikus ciklus) működik?

A BLM és az azóta általunk jellemzett *E. coli* RecQ helikáz esetében az 1 nukleotidegységnyi (nt) elmozdulás per 1 molekula ATP-hidrolízis szoros mechanokémiai kapcsoltság, illetve a transzlokáció monomer formában történő megvalósulása alapján valószínűsítjük, hogy ezen enzimek egy mechanokémiai ciklusa során 1 ATP-molekula hidrolízise történik. Fontos hangsúlyozni azonban, hogy analíziseinkben ezt a paramétert nem tekintjük *a priori* adott feltételnek. A 4. táblázatban felsorolt paramétereket egy olyan kiterjesztett modell alapján definiáltuk, amelyben egy mechanokémiai ciklus – amely definíció szerint két sebesség-heghatározó lépés közötti eseménysorozat – tetszőleges számú ATP-fogyasztási részeseményből (*c* paraméter) és tetszőleges, akár *c*-től különböző számú mechanikai lépésből is állhat (*m* paraméter = egy ciklusban megvalósuló elmozdulás nt egységben). A *c* és *m* paramétereket Fischer és Lohman analízise szerint (204. hiv.) lehetséges meghatározni abban az esetben, ha magas jel-zaj arány mellett felvehetők a végükön fluoreszcensen jelölt DNS-szubsztrátokon történő transzlokáció tranziensei. A sokparaméteres, komplex modellre történő illesztéssel azonban a paramétereket gyakran csak nagy hibával lehet meghatározni, ahogyan azt az említett szerzők is elismerik. Ezért dolgoztuk ki a 22. cikkünkben bemutatott egyszerűsített modellt, amellyel a *c* és *m* paramétereket (azaz a mechanokémiai ciklusok komplexitását) elkülönülten nem kezeli, hanem arra fókuszál, hogy a transzlokáció vagy szálszétválasztás makroszkopikus mechanokémiai paramétereit robusztus módon meg tudjuk határozni (k_{trans} = makroszkopikus haladási sebesség (nt/s), C = makroszkopikus „üzemanyag-fogyasztás” (ATP/nt), P_{macr} = makroszkopikus processzivitás, amelynek segítségével a mikroszkopikus mechanizmustól függetlenül meghatározható a futássorozat várható úthossza ($P_{\text{macr}}/(1-P_{\text{macr}}/C)$)).

22. A post-rigor és pre-powerstroke állapotok közötti átmenet reverzibilis lépés. Ez felveti annak elvi lehetőségét, hogy ATP szintézis jöjjön létre az ellentétes irányú reakcióban. Van

ennek realitása? Mik volnának ennek feltételei? Ebből a szempontból lehet-e analógiát vonni az ATP szintézis motor komplexével (F1FO ATPáz)?

Többen sikerrel kimutatták, hogy megfelelően magas termékkoncentrációk alkalmazásával a miozin ATP-hidrolitikus reakciója visszafordítható. Goody és munkatársai (1977, *Eur. J. Biochem.* 78:317) azt találták, hogy a miozin S1 molekulák 2 %-ának aktívhelyén ATP szintetizálódik ADP-ből és szervesen foszfátból (P_i) a következő körülmények között: pH 8, 120 mM ionerősség, 23°C, 86 μ M S1, 40 mM P_i és 2,5 mM ADP. Sleep és Hutton (1980, *Biochemistry* 19:1276) $1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ sebességi állandójú ATP-szintézist figyelt meg hasonló körülmények között.

Az ATPáz reakció megfordítása miozinban főleg az enzim igen magas (10^{11} M^{-1} nagyságrendű) ATP-affinitása miatt nehezebb, mint az F_1 ATPáz esetében. Emellett az F_0F_1 rendszer az aktomiozinhoz való érdekes hasonlóságokat mutat. Ezek közé tartozik a β -alegység aktívhelyének nukleotid-állapota és az α illetve β alegységek közötti kölcsönhatás erősségének kapcsoltsága, a β -alegység 9-szálú β -lemezének a ciklus közbeni felnyílása illetve záródása, a kétlépéses (90 plusz 30°-os elmozdulásokból álló) munkaütem, illetve a mozgási kinetika erőérzékenysége.

23. Az izomkutatás korábban örökzöld, mára talán inkább elfeledett (de megnyugtatóan meg nem válaszolt) kérdése, hogy az izom-miozin 2 két feje a szarkomérben vajon együttműködik-e? A NM2-n szerzett megfigyelések adhatnak-e választ erre a kérdésre?

Az NM2 rendszeren gyűjtött adatok arra is rávilágítanak, hogy izometrikus vagy erősen terhelt állapotban a mindkét fejjel aktinkötött miozin állapot izomban is megvalósulhat és erőtartó szereppel bírhat.

Az miozin 2 kétfejű felépítése a régóta ismert – a miozin Ca^{2+} -kötése vagy foszforilációja által megvalósuló szabályozásában kulcsjelentőségű – aszimmetrikus kikapcsolt állapot létrejöttét teszi lehetővé. Emellett a közelmúltban arra is fény derült, hogy az aszimmetrikus szerkezet az izom ún. szuperrelaxált állapotát is előidézi, amelyben a fejek a vastag filamentumra visszahajolva annak „törzsével” (a farokrégióval) is kölcsönhatásba lépnek. Ezt különböző ízeltlábú, puhatestű, illetve gerinces izomtípusokban is kimutatták (Craig & Woodhead (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:204, Jung *et al.* (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:3234, Zhao *et al.* (2009) *J. Mol. Biol.* 385:423, Naber *et al.* (2011) *J. Mol. Biol.* 411:943).

24. A jelölt által többször is felemlgetett mechanobiokémia izgalmasnak kínálkozó tudomány. Kérdésem, extrapolálhatóak-e az erővezérelt (vagy erőnek kietett) biokémiai folyamatok a motor enzimeken túl egyéb vagy bármely enzimre?

A motorenzimek erőfüggő mechanizmusai mellett az is ismeretes, hogy a sejtek és az extracelluláris mátrix között fellépő erőhatások – a mátrix-, membrán- illetve intracelluláris fehérjék szerkezetének befolyásolásán keresztül – szabályozzák a sejt-mátrix adhéziók kialakulását (Bershadsky *et al.* (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:472). Jonhson és munkatársai (2007, *Science* 317:663) kimutatták azt is, hogy a vörösvértestekre ható külső hidrodinamikai nyíróerő a spektrin vázfehérje szerkezetét jelentősen befolyásolja és azon új reaktív felszíneket exponál.

25. A disszertáció két, talán leggyakrabban előforduló kifejezése és szava az ATP és a határfok. A jelölt által vizsgált biomolekuláris rendszerek mindegyike ATP felhasználó. Az élő

sejtben található, mára megismert ATP-t használó biomolekulák száma szinte megbabonázó. Általános biológiai kérdésként kínálkozik, meg lehet-e becsülni, hogy az élő sejt biomolekuláris folyamatainak fenntartásához mekkora mennyiségű steady-state ATP felhasználásra van szükség? Ki lehet-e fejezni egy határfok paramétert ebből a szempontból az élő sejtre nézve?

Az élő sejtek energiaforgalma – érdekes módon – hasonló nagyságrendű a prokarióta és eukarióta szervezetek esetében: körülbelül 0.1 pW per g sejttömeg értéknek adódik (Makarieva *et al.* (2005) *Proc. R. Soc. Lond. B.* 272:2219). Ez a teljesítmény ATP-koncentráció-változás egységre számítva körülbelül 3 μ M/s reakciósebességnek felel meg, ami azt jelzi, hogy folyamatos utánpótlás nélkül a sejtek ATP-készlete normál energiafogyasztás mellett néhány perc alatt elfogyna. Az ATP-felhasználás „globális” fizikai határfoka nem könnyen definiálható, és függ a vizsgálati szint megválasztásától. Az mindenesetre ismert, hogy prokarióták esetében az energiaforgalom 2 %-a DNS-replikációra, míg 75 %-a fehérjék kifejezésére fordítódik.

A közelmúltban jelent meg Lane és Martin (2010, *Nature* 467:929) érdekes felvetése. A szerzők e cikkben – többek között Vellai Tibor és Vida Gábor (1999, *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266:1571) korábbi meglátásaival összhangban – annak okát firtatták, hogy a prokarióták között miért nem jelent meg az eukarióta szervezetekre jellemző komplex testszerveződés annak ellenére, hogy minden más „eukarióta jellegzetességnek” tartott sajátásra találhatunk példát a prokarióta világban. Lane és Martin szerint az eukarióta kompartmentalizáció és a mitokondriumok egy sejtmagi genomra eső nagy száma tette lehetővé a genom méret mintegy 5 nagyságrendnyi növekedését – a tömegegységenkénti változatlan energiaforgalom mellett. A prokariótákra jellemző 0.1 fW/génkópia fajlagos energiatermeléssel ellentétben az eukarióta szerveződésben sejtenként és magi génkópiánként 100 fW-nyi teljesítmény áll rendelkezésre, amely növekedés előfeltétele annak, hogy a sejt nagyságrendekkel nagyobb információ-készletet és többféle szabályozómolekulát tudjon fenntartani.

Budapest, 2012. január 25.

Kovács Mihály